

安全监测

盐酸头孢他美酯中有关物质的结构鉴定^{*}王丹丹^{1,2}, 徐雨¹, 高芳¹, 王建^{2**}, 俞辉²

(1. 浙江工业大学, 杭州 310004; 2. 浙江省食品药品检验研究院, 浙江省药品接触材料质量控制研究重点实验室, 杭州 310052)

摘要 目的: 采用核磁共振法鉴定盐酸头孢他美酯原料药中 3 个有关物质的结构。方法: 首先采用制备色谱分离出盐酸头孢他美酯原料药中的 3 个杂质, 然后采用 LC-Q-TOF-MS、LC-Q-TRAP-MS/MS/MS、¹H-NMR、¹³C-NMR、DEPT、¹H-¹H COSY、HSQC、HMBC、IR 和 UV 数据对杂质进行结构鉴定。结果: 通过光谱数据分析, 鉴定出盐酸头孢他美酯原料药中 3 个杂质的结构, 并进行归属。3 个杂质分别为新戊酰头孢他美酯(杂质 I)、头孢他美酯二聚物(杂质 II)、8-(1-硫-2-羰基-3-甲氧基-1-异丁烷)-苯并噻唑(杂质 III), 杂质类型主要为聚合以及头孢他美酯合成副产物。结论: 该研究鉴定了头孢他美酯原料药中的 3 个杂质, 对头孢他美酯的质量控制具有指导意义。

关键词: 核磁共振法; 盐酸头孢他美酯; 有关物质; 分离; 结构鉴定

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)02-0296-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.02.16

Structure elucidation of impurities in
cefetamet pivoxil hydrochloride^{*}WANG Dan-dan^{1,2}, XU Yu¹, GAO Fang¹, WANG Jian^{2**}, YU Hui²

(1. Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310004, China; 2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Key Laboratory of Drug Contacting Materials Quality Control of Zhejiang Province, Hangzhou 310052, China)

Abstract Objective: To identify and characterize the structures of three impurities in cefetamet pivoxil hydrochloride drug substances by NMR. **Methods:** Three impurities in cefetamet pivoxil hydrochloride drug substances were obtained by preparative HPLC, and the structures were elucidated and confirmed by spectral data (LC-Q-TOF-MS, LC-Q-TRAP-MS/MS/MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, ¹H-¹H COSY, HSQC, HMBC, IR and UV) comprehensively. **Results:** Based on the spectral data, the structures of three impurities were characterized as pivalyl cefetamet pivoxil (impurity I), dimer of cefetamet pivoxil (impurity II) and 8-(1-sulfur-2-carbonyl-3-methoxyl-1-isobutane)-benzothiazole (impurity III). The impurities include polymerization and synthesis by-product of cefetamet pivoxil. **Conclusion:** This established method is suitable for the identification of related substances and provides a tool for the quality control of

* 浙江省科技厅公益技术应用研究(分析测试)项目(2017C37022)

** 通信作者 Tel: (0571) 87180327; E-mail: wangjianhw2000@aliyun.com

第一作者 Tel: (0571) 87180327; E-mail: bailifenlan2005@126.com

cefetamet pivoxil hydrochloride.

Keywords: NMR; cefetamet pivoxil hydrochloride; related substances; isolation; structural identification and characterization

盐酸头孢他美酯为第三代口服广谱头孢菌素类抗生素,口服后在体内迅速被水解为有抗菌活性的头孢他美,从而发挥杀菌作用,因为其抗菌能力强以及对 β -内酰胺酶耐受性好,在临床上应用广泛^[1-4]。近年来, β -内酰胺类抗生素的不良反应,尤其是速发过敏反应引起了医药界的高度重视。多年的临床研究证明,引发过敏反应的过敏原是其中的高分子杂质,因此,对该类药物中杂质的研究和控制,是减少其不良反应的重要手段^[5-6]。

文献报道,盐酸头孢他美酯及其制剂中有关物质测定多采用 HPLC 法^[7-10]。李丹凤等^[2]采用质谱法鉴别出盐酸头孢他美酯分散片中的 10 个有关物质,其中包括小分子杂质以及高分子二聚物。本课题组成员前期采用飞行时间质谱和离子阱质谱鉴定出了盐酸头孢他美酯原料药中的 10 个有关物质,并推测了可能的裂解途径^[11],查阅国内外相关文献,均无采用核磁共振法对其中可能的杂质进行结构确证的相关报道。

ICH Q3a 对新药中杂质的控制规定:新原料药中 $\geq 0.1\%$ 的有机杂质,应对其结构特征进行描述^[12]。前期课题组成员已初步对盐酸头孢他美酯原料药中的杂质进行了质谱鉴定^[10],本次研究将盐酸头孢他美酯原料药中含量大、与相邻杂质分离较好的 3 个杂质进行分离制备,并测定其核磁、红外光谱等光谱数据,结合质谱信息,对制备出的杂质进行结构确证,并进行位置归属。本研究分离制备并鉴定了盐酸头孢他美酯中的有关物质,特别是高分子聚合物,对进一步控制其质量,研究不良反应的产生原因,减少不良反应具有实际指导意义。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(二元泵, Agilent G1313 自动进样器, VWD 和 Chemstation 工作站, Agilent 公司), Thermo AcclaimTM 120 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m; 填料:十八烷基硅烷键合硅胶); Agilent Prestart SD-1 型制备液相色谱(二元泵, VWD 和 Chemstation 工作站, Agilent 公司), Agilent Prep-C₁₈(30 mm × 250 mm, 10 μ m; 填料:十八烷基

硅烷键合硅胶); Agilent 6538Q TOF LC-MS 联用仪(Agilent 公司); AB SCIEX 4000 Q TRAPTM 三重四级杆/线性离子阱质谱仪(Agilent 公司); Bruker avance HD 600 MHz 核磁共振仪(Bruker 公司), TMS 为内标; Nicolet 6700 FT-IR 红外光谱仪(尼高力公司),溴化钾压片; Virtis advantage 2XL 冷冻干燥仪(VIRTIS 公司)。

盐酸头孢他美酯原料药(批号 070504),四川 A 药业有限责任公司提供,结构见图 1。甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水。

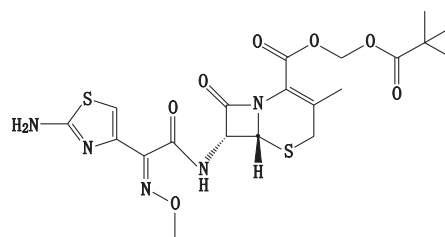


图 1 头孢他美酯结构图

Fig. 1 The structure of cefetamet pivoxil

2 方法与结果

2.1 色谱质谱条件

2.1.1 色谱条件(联接 VWD 或质谱检测器) 色谱柱: Thermo AcclaimTM 120 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m); 流动相: 10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵-甲醇-乙腈(327:133:504); 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μ L。

2.1.2 色谱条件(分离制备) 色谱柱: Agilent Prep-C₁₈(30 mm × 250 mm, 10 μ m); 流动相: 乙腈-甲醇-水(504:133:327); 流速: 25 mL·min⁻¹; 进样量: 1 mL。分离液浓缩除去流动相,然后冷冻干燥。杂质 I、II 和 III 的纯度分别为 99.6%、92.4% 和 98.9%。

2.1.3 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),正离子模式。Agilent 6538Q TOF LC-MS 联用仪质谱参数:毛细管电压 3.0 kV,锥电压 35 V,离子源温度 120 $^{\circ}$ C,鞘气温度 300 $^{\circ}$ C,锥孔气流速 50 L·h⁻¹,鞘气流速 400 L·h⁻¹。AB SCIEX 4000 Q TRAPTM 三重四级杆/线性离子阱质谱仪质谱参数:雾化气压力 276 kPa,干燥气压力 276 kPa,气帘气压力 69 kPa,干燥气温度

550 ℃, 喷雾毛细管压力 5 kV, DP 70 V, EP 10 V, CE 35 V。

2.1.4 核磁共振 一维 ^{13}C -NMR 波谱在装配 5 mm BBO 探头的 Bruker avance HD 600 MHz 核磁共振仪上采集, 采样时间 1.1 s, 弛豫时间 1 s, 测量温度 25 ℃, 谱宽 200, 采样点数 64 k, 扫描次数 32 769 次, 线展宽因子 0.3 Hz。

一维 ^1H -NMR 波谱在装配 5 mm BBO 探头的 Bruker avance HD 600 MHz 核磁共振仪上采集。采样时间 4.4 s, 弛豫时间 2 s, 测量温度 25 ℃, 谱宽 13, 采样点数 64 k, 扫描次数 128 次, 线展宽因子 0.3 Hz。

二维 COSY-NMR 波谱在装配 5 mm BBO 探头的 Bruker avance HD 600 MHz 核磁共振仪上采集。采样时间 0.2 s, 弛豫时间 1.5 s, 测量温度 25 ℃, 谱宽 13, 采样点数 64 k, 扫描次数 16 次。

二维 HSQC-NMR 波谱在装配 5 mm BBO 探头的 Bruker avance HD 600 MHz 核磁共振仪上采集。采样时间 0.2 s, 弛豫时间 1.4 s, 测量温度 25 ℃, 谱宽 δ_{H} 13, δ_{C} 200, 采样点数 64 k, 扫描次数 16 次。

二维 HMBC-NMR 波谱在装配 5 mm BBO 探头的 Bruker avance HD 600 MHz 核磁共振仪上采集。采样时间 0.2 s, 弛豫时间 1.4 s, 测量温度 25 ℃, 谱宽 δ_{H} 13, δ_{C} 200, 采样点数 64 k, 扫描次数 16 次。

2.2 供试品溶液制备

2.2.1 液相色谱-质谱分析用供试品溶液制备 取盐酸头孢他美酯原料药适量, 加“2.1.1”项下流动相溶解并稀释制成每 1 mL 约含 5.0 mg 的溶液, 进行液相色谱-质谱分析。

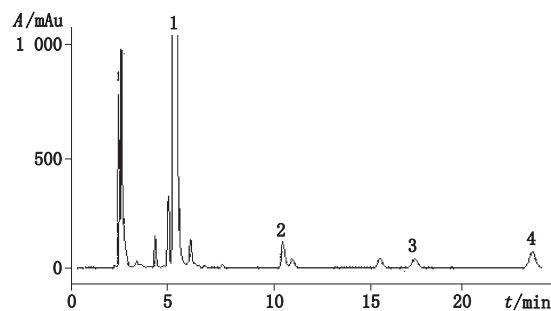
2.2.2 液相制备色谱用供试品溶液制备 取盐酸头孢他美酯原料药适量, 加“2.1.2”项下流动相溶解并稀释制成每 1 mL 约含 30 mg 的溶液, 进行制备色谱分离。

2.3 结果分析

利用“2.1.1”项下色谱条件检测盐酸头孢他美酯原料药中杂质, 记录 HPLC-UV 色谱图, 见图 2。

2.3.1 杂质 I 结构确证 ESI 质谱图中显示正离子模式下杂质 I 的分子离子峰为 m/z 596.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 说明其相对分子质量为 595。Q TOF 高分辨质谱显示, 杂质 I 的分子式为 $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}_2$ 。

^1H -NMR 谱显示在高位移 δ_{H} 12.14 和 δ_{H} 9.68 处有 2 个峰, 为分子中的 2 个仲胺基, 由于共轭结构影响, NH-10' 化学位移较高, 所以 δ_{H} 12.14 为 NH-10'



1. 头孢他美酯 (cefetamet pivoxil) 2. 杂质 I (impurity I) 3. 杂质 II (impurity II) 4. 杂质 III (impurity III)

图 2 盐酸头孢他美酯原料药高效液相色谱图

Fig. 2 Chromatogram of cefetamet pivoxil hydrochloride drug substance

峰, δ_{H} 9.68 为 NH-9' 峰; C-13~15 和 C-13'~15' 环境相似, 均为甲基峰, 所以在 ^1H -NMR 谱的化学位移最低处, 共显示 6 个甲基的 18 个 H; C-8' 为甲基峰, 与杂原子 O 相连, 在 δ_{H} 3.88 处显示 1 个 3 个 H 的单峰; C-7' 上的 H 为烯氢, 在 δ_{H} 7.35 处显示 1 个 H 的峰; H-6 和 H-7 分别在 δ_{H} 5.16 和 δ_{H} 5.40 处显示 1 个 H 的峰; H-10 在 δ_{H} 5.8 附近显示 2 个 H 的峰。

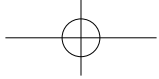
^{13}C -NMR 谱显示杂质 I 共含有 25 个碳; 化学位移较高处为羰基峰, 中间为烯碳峰, 较低处为脂肪族烷基碳峰; 由于给电子基团的影响, 最高处 δ_{C} 177.69 为 C-11 峰, δ_{C} 176.51 为 C-11' 峰; 由于吸电子的影响, 最低处 δ_{C} 19.92 为 C-16 峰; δ_{C} 26.9 为 C-13~15、C-13'~15' 的 6 个碳原子峰。

DEPT (135°) 谱上共出现 13 个峰, 其中 11 个为正峰, 2 个为负峰, 说明杂质 I 分子中含有 11 个伯碳和叔碳、2 个仲碳和 12 个 DEPT 谱中未出现的季碳; 由于烯碳化学位移较高, 所以认定 DEPT 谱上正峰中的 δ_{C} 115.3 为 C-7' 峰; DEPT 谱上 2 个负峰为仲碳, 分子中 C-10 和 C-4 为仲碳, 由于 C-10 处于富电子环境中, 所以 C-10 较 C-4 化学位移较高, 则 δ_{C} 79.9 为 C-10 峰, δ_{C} 29.8 为 C-4 峰。

^1H - ^1H COSY 显示 H-6 和 H-7 相关。

HSQC 谱显示 C-4/H-4、C-7/H-7、C-10/H-10、C-16/H-16、C-8'/H-8'、C-13、14、15、13'、14'、15'/H-13、14、15、13'、14'、15' 相关, 根据已知的 δ_{C} 或者 δ_{H} , 对相关峰进行归属并确认。

HMBC 谱可以根据 C-H 远程相关情况对峰进行归属、验证和确认。 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR、2D-NMR 归属见表 1。

表 1 杂质 I ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 和 2D-NMR 数据归属Tab. 1 The data and assignments of ^1H -NMR, ^{13}C -NMR and 2D-NMR data for impurity I

位置 (position)	δ_{H}	δ_{C}	DEPT (135°)	^1H - ^1H COSY (H $\rightarrow$ H)	HSQC (H $\rightarrow$ C)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	/	/	/	/	/	/
2	/	133.94	/	/	/	/
3	/	121.51	/	/	/	/
4	3.62 (d)	29.84	CH_2	/	C-4	C-2, 3
5	/	/	/	/	/	/
6	5.40 (1H, s)	59.10	CH	H-7	/	/
7	5.16 (1H, s)	57.70	CH	H-6	C-7	C-8
8	/	163.18	/	/	/	/
9	/	159.66	/	/	/	/
10	5.79-5.84 (2H, d)	79.90	CH_2	/	C-10	C-9, 11
11	/	177.69	/	/	/	/
12	/	39.58	/	/	/	/
13	1.24-0.86 (9H, m)	26.92	CH_3	/	C-13, 14, 15	C-11, 12, 14, 15
14				/		C-11, 12, 13, 15
15				/		C-11, 12, 13, 14
16	2.02 (3H, s)	19.92	CH_3	/	C-16	C-2, 3, 4
1'	/	164.05	/	/	/	/
2'	/	149.15	/	/	/	/
3'	/	141.92	/	/	/	/
4'	/	/	/	/	/	/
5'	/	161.19	/	/	/	/
6'	/	/	/	/	/	/
7'	7.35 (1H, s)	115.31	CH	/	/	/
8'	3.88 (3H, s)	62.54	CH_3	/	C-8'	/
9'	9.68 (1H, s)	/	/	/	/	/
10'	12.14 (1H, s)	/	/	/	/	/
11'	/	176.51	/	/	/	/
12'	/	39.37	/	/	/	/
13'	1.24-0.86 (9H, m)	26.92	CH_3	/	C-13', 14', 15'	C-11', 12', 14', 15'
14'				/		C-11', 12' 13', 15'
15'				/		C-11', 12' 13', 14'

IR γ_{max} (KBr cm^{-1}): 3 447.3 (N-H 伸缩振动), 3 197.8 (CH=C- 伸缩振动), 1 790.8 (β -内酰胺 C=O 伸缩振动), 1 749.3 (C=O 伸缩振动), 1 647.8 (酰胺 C=O 伸缩振动), 1 541.3 (N-H 弯曲振动), 1 398.3 (C-H 弯曲振动)。

基于以上数据, 杂质 I 鉴定为新戊酰头孢他美酯, 结构见图 3-A。

2.3.2 杂质 II 结构确证 ESI 质谱图中显示正离子模式下杂质 II 的分子离子峰为 m/z 1 035.2 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 说明其相对分子质量为 1 034。Q-TOF 高分辨质谱显示杂质 II 的分子式为 $\text{C}_{41}\text{H}_{50}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{S}_4$ 。

^1H -NMR 谱高化学位移处为杂质 II 分子中 4

个仲胺基的峰, 由于 β -内酰胺环吸电子的影响, 使得 NH-9'', 9''' 化学位移较 NH-10'', 10''' 高, 所以 δ_{H} 9.40-9.61 为 NH-9'', 9''' 峰, δ_{H} 8.17-8.19 为 NH-10'', 10''' 峰; C-13~15 和 C-13'~15' 环境一样, 均为甲基峰, 所以在 ^1H -NMR 谱的化学位移最低处, 共显示 6 个甲基的 18 个 H; C-8''、C-8''' 为甲基峰, 与杂原子 O 相连, 在 δ_{H} 3.86 处显示 1 个 6 个 H 的单峰; C-7''、C-7''' 上的 H 为烯氢, 在 δ_{H} 7.02 处显示 2 个氢; H-6、6' 和 H-7、7' 分别在 δ_{H} 5.1 和 δ_{H} 5.7 附近显示 2 个 H 的峰; H-10、10' 在 δ_{H} 5.8 附近显示 4 个氢的峰。从 ^1H -NMR 谱可以看出, 杂质 II 结构高度对称。

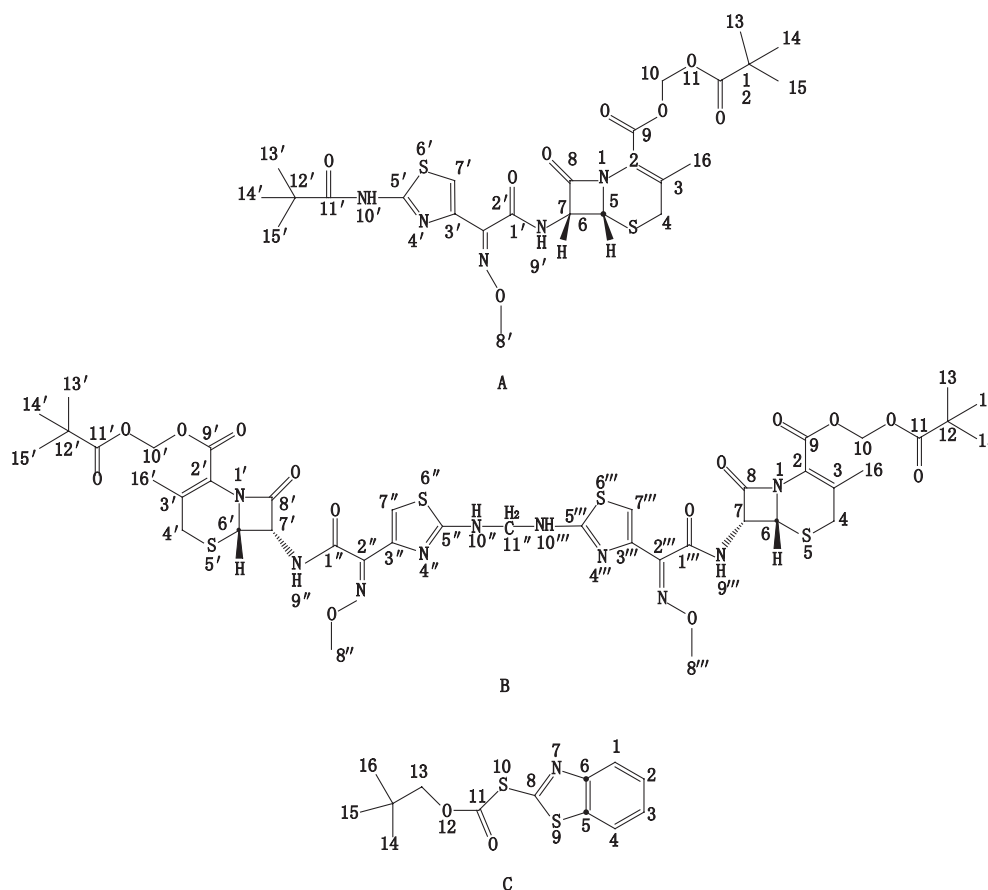


图3 杂质Ⅰ(A)、杂质Ⅱ(B)、杂质Ⅲ(C)化学结构图

Fig. 3 Chemical structures of impurity I (A), impurity II (B), impurity III (C)

^{13}C -NMR 谱显示杂质Ⅱ共含有41个碳;化学位移较高处为羰基峰,中间为烯碳峰,较低处为脂肪族烷基碳峰;由于给电子基团的影响,最高处 δ_{c} 176.51为C-11、11'峰;由于吸电子影响,最低处 δ_{c} 19.91为C-16、16'峰; δ_{c} 26.98为C-13~15、C-13'~15'的6个碳原子峰。从 ^{13}C -NMR谱可看出,杂质Ⅱ结构高度对称。

DEPT(135°)谱上共出现21个峰,其中16个峰为正峰,5个为负峰,以上信息说明杂质Ⅱ分子中含有16个伯碳和叔碳、5个仲碳和20个DEPT谱中未出现的季碳;由于烯碳化学位移较高,所以认定DEPT谱上正峰中的 δ_{c} 110.0为C-7''、7'''峰;DEPT谱上5个负峰为仲碳,分子中C-10、10'、C-4、4'和C-11''为仲碳,由于C-10、10'、C-11''相比C-4、4'处于电子富集环境,所以 δ_{c} 79.8为C-10、10'峰, δ_{c} 41.66为C-4、4'峰, δ_{c} 79.9为C-10峰, δ_{c} 29.8为C-4、4'峰。从DEPT谱可以看出杂质Ⅱ结构高度对称。

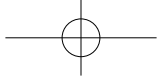
^1H - ^1H COSY显示H-6和H-7相关,H-6'和H-7'相关,H-11''和H-10''、H-10'''相关。

HSQC谱显示C-4/H-4,C-4'/H-4',C-6/H-6,C-6'/H-6',C-7/H-7,C-7'/H-7',C-10/H-10,C-10'/H-10',C-16/H-16,C-16'/H-16',C-8''/H-8'',C-8'''/H-8''',C-11''/H-11'',C-13、14、15、13'、14'、15'/H-13、14、15、13'、14'、15'相关,可根据已知的 δ_{c} 或者 δ_{H} ,对相关峰进行归属并确认。

HMBC谱可以根据C-H远程相关情况对峰进行归属、验证和确认。 ^1H -NMR和 ^{13}C -NMR、2D-NMR归属见表2。

IR γ_{max} (KBr cm^{-1}): 3 435.3 (N-H 伸缩振动), 3 186.6 (CH=C- 伸缩振动), 1 782.4 (β -内酰胺 C=O 伸缩振动), 1 676.0 (酰胺 C=O 伸缩振动), 1 541.3 (N-H 弯曲振动), 1 399.1 (C-H 弯曲振动)。

基于以上数据,杂质Ⅱ结构高度对称,鉴定为头孢他美酯二聚体,结构见图3-B。

表 2 杂质 II ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 和 2D-NMR 数据归属Tab. 2 The data and assignments of ^1H -NMR, ^{13}C -NMR and 2D-NMR data for impurity II

位置 (position)	δ_{H}	δ_{C}	DEPT (135°)	^1H - ^1H COSY ($\text{H} \rightarrow \text{H}$)	HSQC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$)	HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$)
1, 1'	/	/	/	/	/	/
2, 2'	/	133.94	/	/	/	/
3, 3'	/	121.43–121.52	/	/	/	/
4, 4'	3.40–3.64 (4H, dd)	29.79–29.84	CH_2	/	C-4, 4'	C-2, 2', 3, 3'
5, 5'	/	/	/	/	/	/
6, 6'	5.11–5.15 (2H, dd)	57.69–57.73	CH	H-7, 7'	C-6, 6'	/
7, 7'	5.73–5.76 (2H, dd)	58.81–59.11	CH	H-6, 6'	C-7, 7'	C-8, 8'
8, 8'	/	164.10–164.38	/	/	/	/
9, 9'	/	161.21	/	/	/	/
10, 10'	5.78–5.90 (4H, dd)	79.83–79.93	CH_2	/	C-10, 10'	C-9, 9', 11, 11'
11, 11'	/	176.51	/	/	/	/
12, 12'	/	38.69	/	/	/	/
13, 13'	1.05–1.26 (18H, s)	26.98	CH_3	/	C-13, 14, 15, 13', 14', 15'	C-11, 11', 12, 12', 14, 14', 15, 15'
14, 14'				/		C-11, 11', 12, 12', 13, 13', 15, 15'
15, 15'				/		C-11, 11', 12, 12', 13, 13', 14, 14'
16, 16'	2.01 (6H, s)	19.91	CH_3		C-16, 16'	C-2, 2', 3, 3', 4, 4'
1'', 1'''	/	166.34, 168.65	/	/	/	/
2'', 2'''	/	149.52, 150.65	/	/	/	/
3'', 3'''	/	143.10	/	/	/	/
4'', 4'''	/	/	/	/	/	/
5'', 5'''	/	163.09–163.48	/	/	/	/
6'', 6'''	/	/	/	/	/	/
7'', 7'''	7.02 (2H, s)	110.01	CH	/		/
8'', 8'''	3.86 (6H, s)	62.41–62.50	CH_3	/	C-8'', 8'''	/
9'', 9'''	9.40–9.61 (2H, dd)	/	/	/	/	/
10'', 10'''	8.17–8.19 (2H, t)	/	/	H-11''	/	/
11''	4.59–4.70 (2H, dd)	41.66	CH_2	H-10'', 10'''	C-11''	/

2.3.3 杂质 III 结构确证 ESI 质谱图中显示正离子模式下杂质 III 的分子离子峰为 m/z 282.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 说明其相对分子质量为 281。Q-TOF 高分辨质谱显示杂质 III 的分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}_2$ 。

^1H -NMR 谱显示分子中含有 ABMN 系统芳香环 (H-1, 4, δ_{H} 7.91–8.07 和 H-2, 3, δ_{H} 7.40–7.53); 化学位移最低处 δ_{H} 1.15 为 C-14~16 3 个甲基的 9 个 H 峰; δ_{H} 5.86 处显示 C-13 的 2 个氢。

^{13}C -NMR 谱显示杂质 III 共含有 13 个碳; 化学位移较高处为羰基峰, 中间为烯碳峰, 较低处为脂肪族烷基碳峰; 化学位移最高处 δ_{C} 177.3 为 C-11

峰, 最低处 δ_{C} 27.0 为 C-14~16 峰; 由于杂原子给电子影响, δ_{C} 65.78 为 C-13 峰; 由于杂原子给电子影响, 烯碳 C-8、6、5 位移从高到低分别为 δ_{C} 164.5、 δ_{C} 152.9 和 δ_{C} 135.5; 芳香环 4 个烯碳峰均在 δ_{C} 125 附近。

DEPT (135°) 谱上共出现 8 个峰, 其中 7 个峰为正峰, 1 个为负峰, 以上信息说明杂质 III 分子中含有 8 个伯碳和叔碳、1 个仲碳和 4 个 DEPT 谱中未出现的季碳; 由于烯碳化学位移较高, 所以认定 DEPT 谱上正峰中的 δ_{C} 125 附近为 C-1~4 峰; DEPT 谱上 1 个负峰为仲碳, 分子中 C-13 为仲碳, 所以 δ_{C} 65.8 为



C-13 峰。
¹H-¹H COSY 显示 H-1 和 H-2、H-3、H-4 相关。
HSQC 谱显示 C-1/H-1, C-2/H-2, C-3/H-3, C-4/H-4, C-12/H-12, C-14、15、16/H-14、15、16 相关, 可

根据已知的 δ_C 或者 δ_H, 对相关峰进行归属并确认。
HMBC 谱可以根据 C-H 远程相关情况对峰进行归属、验证和确认。¹H-NMR 和 ¹³C-NMR、2D-NMR 归属见表 3。

表 3 杂质Ⅲ ¹H-NMR、¹³C-NMR 和 2D-NMR 数据归属
Tab. 3 The data and assignments of ¹H-NMR, ¹³C-NMR and 2D-NMR data for impurity Ⅲ

位置 (position)	δ _H	δ _C	DEPT (135°)	¹ H- ¹ H COSY (H → H)	HSQC (H → C)	HMBC (H → C)
1	7.91-8.07 (1H, d)	122.46	CH	H-2	C-1	C-2, 6
2	7.40-7.53 (1H, t)	127.08	CH	H-1	C-2	C-1, 4, 5, 6
3	7.40-7.53 (1H, t)	125.44	CH	H-4	C-3	C-1, 4, 6
4	7.91-8.07 (1H, d)	122.08	CH	H-3	C-4	C-1, 3, 5
5	/	135.49	/	/	/	/
6	/	152.93	/	/	/	/
7	/	/	/	/	/	/
8	/	164.54	/	/	/	/
9	/	/	/	/	/	/
10	/	/	/	/	/	/
11	/	177.30	/	/	/	/
12	/	/	/	/	/	/
13	5.86 (2H, s)	65.78	CH ₂	/	C-12	C-8, 11
14	1.15 (9H, s)	27.00	CH ₃	/	C-14, 15, 16	C-11, 12, 15, 16
15				/		C-11, 12, 14, 16
16				/		C-11, 12, 14, 15

¹H-NMR 和 ¹³C-NMR、2D-NMR 归属见表 3。IR γ_{max} (KBr cm⁻¹): 3 151.6 (CH=C- 伸缩振动), 1 739.3 (C=O 伸缩振动), 1 400.2 (C-H 弯曲振动)。

基于以上数据, 杂质Ⅲ鉴定为 8-(1- 硫 -2- 羰基 -3- 甲氧基 -1- 异丁烷)- 苯并噻唑, 为盐酸头孢他美酯合成副产物, 结构见图 3-C。

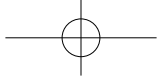
3 结论

本文采用液相制备色谱, 从盐酸头孢他美酯原料药中分离制备出 3 个有关物质, 并采用质谱和光谱技术, 包括 ¹H-NMR、¹³C-NMR、DEPT、¹H-¹H COSY、HSQC、HMBC、IR 技术对其进行结构确证, 确证 3 个杂质分别为新戊酰头孢他美酯 (杂质 I)、头孢他美酯二聚物 (杂质 II) 和 8-(1- 硫 -2- 羰基 -3- 甲氧基 -1- 异丁烷)- 苯并噻唑 (杂质 III)。结果表明, 杂质类型主要为头孢他美酯聚合和头孢他美酯合成副产物。本研究对进一步控制盐酸头孢他美酯原料药

质量, 研究不良反应的产生原因, 减少不良反应具有实际指导意义。

参考文献

[1] 马伟杭, 陈亚岗, 郑经川, 等. 盐酸头孢他美酯治疗细菌感染的多中心临床研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2001, 26 (2): 139
MA WH, CHEN YG, ZHENG JC, et al. A multiple center randomized controlled clinical study of cefetamet pivoxil hydrochloride in the treatment of bacterial infectious diseases [J]. Chin J Antibiot, 2001, 26 (2): 139
[2] 李丹凤, 颜其双, 邓鸣, 等. 盐酸头孢他美酯分散片有关物质的色谱-质谱结构鉴定 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37 (3): 451
LI DF, YAN QS, DENG M, et al. Separation and identification of related substances in cefetamet pivoxil hydrochloride dispersible tablets by LC-MS method [J]. Chin J Pharm Anal, 2017, 37 (3): 451
[3] 俞绍鑫, 吴朝倩. 盐酸头孢他美酯的药理与临床应用 [J]. 中国抗生素杂志, 2001, 26 (2): 153
YU SX, WU CQ. Pharmacology and clinical application of cefetamet



- pivoxil hydrochloride [J]. *Chin J Antibiot*, 2001, 26(2): 153
- [4] 刘家健, 刘敦苒, 曾晓辉, 等. 国产盐酸头孢他美酯的制备[J]. *中国抗生素杂志*, 2001, 26(2): 151
- LIU JJ, LIU DF, ZENG XH, *et al.* The process development of domestic cefetamet pivoxil hydrochloride [J]. *Chin J Antibiot*, 2001, 26(2): 151
- [5] 夏鸣, 杭太俊, 李小敏, 等. β -内酰胺类抗生素中高分子聚合物杂质检查方法的研究综述[J]. *药学进展*, 2007, 31(11): 501
- XIA M, HANG TJ, LI XM, *et al.* A review on the test methods for high-molecular weight polymer impurities in β -lactam antibiotics [J]. *Prog Pharm Sci*, 2007, 31(11): 501
- [6] 赵静, 王晶, 陈海怡, 等. β -内酰胺类抗生素的皮肤过敏试验现状与建议[J]. *中国临床药理学杂志*, 2009, 25(2): 158
- ZHAO J, WANG J, CHEN HY, *et al.* Current situation and suggestion about skin sensitivity test of β -lactam antibiotics [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2009, 25(2): 158
- [7] 贾可, 夏永恒, 张治云, 等. HPLC 测定盐酸头孢他美酯颗粒的有关物质[J]. *食品与药品*, 2014, 16(4): 270
- JIA K, XIA YH, ZHANG ZY, *et al.* Determination of related substances in cefetamet pivoxil hydrochloride granules by HPLC [J]. *Food Drug*, 2014, 16(4): 270
- [8] 王建, 王丹丹, 洪利娅, 等. HPLC 法测定盐酸头孢他美酯中的有关物质和聚合物[J]. *药物分析杂志*, 2015, 35(2): 295
- WANG J, WANG DD, HONG LY, *et al.* HPLC simultaneous determination of related substances and polymers in cefetamet pivoxil hydrochloride [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2015, 35(2): 295
- [9] 李丹凤, 黄丽丽, 刘庄蔚, 等. 盐酸头孢他美酯及其制剂中有关物质的 HPLC 法测定[J]. *中国医药工业杂志*, 2016, 47(7): 918
- LI DF, HUANG LL, LIU ZW, *et al.* Determination of the related substances in cefetamet pivoxil hydrochloride and its preparations by HPLC [J]. *Chin J Pharm*, 2016, 47(7): 918
- [10] 任凤英, 黎鹏, 李直, 等. RP-HPLC 法测定盐酸头孢他美钠含量和有关物质[J]. *中国抗生素杂志*, 2012, 37(12): 916
- REN FY, LI P, LI Z, *et al.* Determination of cefetamet sodium and its related substances by HPLC [J]. *Chin J Antibiot*, 2012, 37(12): 916
- [11] WANG DD, WANG F, WANG J. Characterization of the impurities and isomers in cefetamet pivoxil hydrochloride by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 111: 71
- [12] ICH Guideline Q3A(R) Impurities in New Drug Substances. Step 4 [S]. 2002

(本文于 2018 年 1 月 24 日修改回)